

(54) WATER INSOLUBLE HYDROGEL AND PRODUCTION THEREOF

(11) 2-86838 (A) (43) 27.3.1990 (19) JP
 (21) Appl. No. 63-236470 (22) 22.9.1988
 (71) TERUMO CORP (72) YASUHIRO KAWAMURA
 (51) Int. Cl⁵. B01J13/00, A61B8/00, C08F16/06, C08F26/10, G01N29/28

PURPOSE: To obtain hydrogel having a high water content and superior compatibility with a living body by irradiating a mixed aq. soln. contg. PVA and polyvinylpyrrolidone with an ionizing radiation to attain a specified cross-linking degree and by carrying out freezing and thawing.

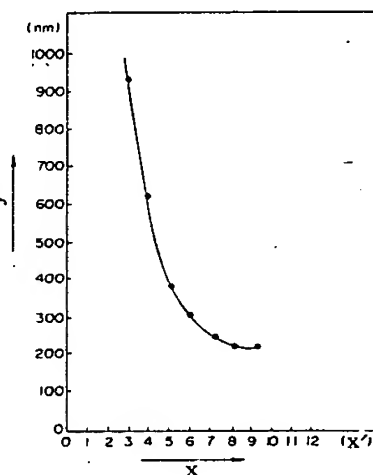
CONSTITUTION: A mixed aq. soln. contg. PVA and polyvinylpyrrolidone is irradiated with the ionizing radiation to cross-link PVA alone, polyvinylpyrrolidone alone and PVA and polyvinylpyrrolidone together to such a cross-linking degree that 50-99wt.% water is contained. Freezing and thawing are then carried out to produce water insoluble hydrogel. The mixed aq. soln. is preferably irradiated with 0.5-6Mrad γ -ray. The pref. freezing temp. is -6 to -120°C and the pref. freezing time is $\geq 15\text{min}$.

(54) LIPOSOME AND PRODUCTION THEREOF

(11) 2-86841 (A) (43) 27.3.1990 (19) JP
 (21) Appl. No. 63-238868 (22) 26.9.1988
 (71) TERUMO CORP (72) KAZUHIKO SUZUKI(1)
 (51) Int. Cl⁵. B01J13/02, A61K9/127//A61K37/14

PURPOSE: To allow liposome to take in more contents with less lipid per one liposome and to lower the concn. of liposome suspended and the viscosity of the suspension by regulating the average outside diameter of particles of liposome contg. a taken-in soln. to 180-300nm.

CONSTITUTION: Liposome membrane forming lipid is suspended in an aq. hemoglobin soln. until the average outside diameter of particles becomes 180-300nm. The resulting suspension is subjected to high ejection treatment to obtain desired liposome. The concn. of liposome suspended is lowered and a load on a circulatory organ is relieved at the time of injection into blood.



x: stirring time, x': min., y: diameter of suspended particles

(54) METHOD FOR SEPARATING AND RECOVERING MINERAL BY SELECTIVE HEATING DUE OF DIELECTRIC LOSS

(11) 2-86842 (A) (43) 27.3.1990 (19) JP
 (21) Appl. No. 62-331049 (22) 25.12.1987
 (71) AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL (72) KOKI YOTSUMOTO(1)
 (51) Int. Cl⁵. B01J19/08, B01D11/02

PURPOSE: To separate and recover a mineral by utilizing the selective heating of the mineral due to dielectric loss proper to the constituents of the mineral.

CONSTITUTION: High frequency of 30MHz-30GHz or an alternating electric field is applied to mineral particles to produce a temp. difference among the mineral particles having different compsns. by the generation of heat due to dielectric loss. By utilizing the temp. difference, the minerals are separated. When the mineral particles are heated with the high frequency or the alternating electric field, it is necessary to prevent the heat transmission due to contact between the particles.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-86841

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)3月27日

B 01 J 13/02
A 61 K 9/127
// A 61 K 37/14

A 7417-4C
8615-4C
8317-4C

B 01 J 13/02

Z

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全4頁)

⑮ 発明の名称 リボソームおよびその製法

⑯ 特 願 昭63-238868

⑰ 出 願 昭63(1988)9月26日

⑱ 発 明 者 鈴木 一 比 好 静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内
⑲ 発 明 者 後 藤 博 静岡県富士市大淵2656番地の1 テルモ株式会社内
⑳ 出 願 人 テルモ株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号
㉑ 代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外1名

明 細 書

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は内部に水溶液を取り込んでなる外径の小さいリボソームおよびその製法に関するものである。

本発明のリボソームは内部水溶液に種々の生理活性物質あるいは薬物を含有することができるので各種の医療分野において用いられ、かつ外径が小さいので、特に人工赤血球として好適に使用される。

〔従来の技術〕

生理活性物質や薬物の水溶液をリボソームによりマイクロカプセル化してドラッグデリバリーシステムなどに応用する試みは多く行なわれている。リボソームの一般的な製造方法としては薄膜法、逆相法、透析法などが知られている。これらの方法は濃度および粘度の低い水溶液をリボソーム化することはできるが人工赤血球の調製の際に要求されるような濃度および粘度の高い水溶液をリボソーム化することは困難である。

1. 発明の名称 リボソームおよびその製法
2. 特許請求の範囲
 - 1) 内部に水溶液を取り込んでなるリボソームであって、リボソームの平均粒子外径が180~300nmであることを特徴とするリボソーム。
 - 2) 前記リボソームの膜形成脂質の重量を内部水溶液の溶質重量で除した値が0.40~1.67である請求項1記載のリボソーム。
 - 3) 内部水溶液がヘモグロビン水溶液である請求項1または2記載のリボソーム。
 - 4) リボソーム膜形成脂質をヘモグロビン水溶液に、平均粒子外径が180~300nmとなるまで懸濁させ、次いで該懸濁液を高圧吐出処理することを特徴とする請求項3記載のリボソームの製法。
 - 5) リボソーム膜形成脂質をヘモグロビン水溶液に攪拌型細胞破砕機を用いて懸濁する請求項4記載のリボソームの製法。

本発明者等は先にフレンチプレス・パール細胞破砕機などとして知られる高圧吐出型乳化機を用いて高濃度・高粘度の水溶液をリボソーム化する方法を開発した(開昭53-86117)。しかしこの方法においても高圧吐出処理前におけるリボソーム膜形成脂質の水溶液への懸濁が不十分であるとカプセル化効率がよくないという問題があった。

【発明が解決しようとする問題点】

天然赤血球中のヘモグロビン濃度は33%前後であり、人工赤血球においても酵素運搬の効率の点からリボソーム内のヘモグロビン水溶液の濃度は少なくとも30%以上は必要である。そこで高濃度・高粘度のヘモグロビン水溶液をリボソーム化する技術が要求される。また人工赤血球は血液循環系内へ直接投与されるので生体への影響を考慮してリボソーム膜形成脂質の量はできるだけ少ないのが望ましい。即ち、ヘモグロビンに対するリボソーム膜形成脂質の比はできるだけ小さいのが望ましい。さらに、血管の閉塞を防止するため、リボソームの径径も一定以下の大きさであること

が必要とされる。

本発明はかかる要望を満たしたリボソームおよびその製造方法を提供することを目的とするものである。

【問題点を解決するための手段】

上記の目的を達成するため、本発明は次の構成を有する。

- 1) 内部に水溶液を取り込んでなるリボソームであって、リボソームの平均粒子外径が180~300nmであることを特徴とするリボソーム。
- 2) 前記リボソームの膜形成脂質の重量を内部水溶液の溶質重量で除した値が0.40~1.67である1項記載のリボソーム。
- 3) 内部水溶液がヘモグロビン水溶液である1または2項記載のリボソーム。
- 4) リボソーム膜形成脂質をヘモグロビン水溶液に、平均粒子外径が180~300nmとなるまで懸濁させ、次いで該懸濁液を高圧吐出処理することを特徴とする3項記載のリボソームの製法。
- 5) リボソーム膜形成脂質をヘモグロビン水溶液

に模倣型細胞破砕機を用いて懸濁する4項記載のリボソームの製法。

本発明におけるリボソーム膜形成脂質には特に制限はなく、リボソームを形成するものであれば天然または合成の脂質が使用可能である。特にリン脂質が好適に使用され、その例として、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、スフィンゴミエリン、カルジオリピンおよびこれらを常法に従って水溶液に添加したものがあげられ、これらを組合せて用いることもできる。さらにリボソーム膜の構成成分には所望によりステロール等の膜構造強化剤や電荷付与物質(例えばステアリン酸、オレイン酸、ミリスチン酸、リノール酸、リノレン酸等)を添加することができる。リボソームの内部に取り込まれる溶液には特に制限はなく、任意の種類の化学物質の水溶液が使用されうる。化学物質の例としては、前述したヘモグロビンの他、 β -グルク

ロンダーゼ、ヘキサミンダーゼ、アミノグルコシダーゼ等の高分子化合物があげられる。

水溶液の濃度および粘度は、リボソームの用途に応じて溶質の種類が決定され、それに従って決定される。本発明における水溶液の粘度は10~3000cP(4℃)でありうる。人工赤血球を製する場合には、ヘモグロビン濃度30~60%(v/v)の水溶液を使用するのが好ましく、この場合の粘度は10~3000cP(4℃)である。

本発明のリボソームの平均外径は180~300nmであり、好ましくは200~300nm、より好ましくは200~250nmである。リボソームの外径が180nmより小さいと、エネルギー的に不安定な微小粒子が融合をおこして数ミクロンから数十ミクロンの大きな粒子を形成しやすい。また300nmより大きいと血管内に投与した場合に毛細血管をつまらせる原因となることがある。またリボソーム膜形成脂質の重量(L)とリボソーム内部に取り込まれた水溶液の溶質の重量(H)との比は、カプセル化効率および生体への安全性の観点から重要で

あり、前者を後者で除した値(L/H)は本発明においては0.40~1.67である。この値が0.40より大きいと脂質膜が溶質の漏出などのおそれがない十分な厚さになり、1.67より小さいと脂質の投与量が減少し、またリボソーム懸濁液の粘性も低くなるので安全性の面から望ましい。L/Hの値は、好ましくは0.50~1.00であり、より好ましくは0.50~0.80である。

本発明のリボソームは、前記リボソーム膜形成脂質の粉末を前記内部水溶液に粒子外径が180~300nmとなるまで懸濁させ、該懸濁液を高圧吐出処理することによって製造される。リボソーム膜形成脂質は前述したように、膜構造強化剤や電荷付与剤を適宜含有することができる。水添ホスファチジルコリン、コレステロール、ミリスチン酸を有機溶媒に溶解して均一に混合した後、凍結乾燥した粉末(プレソーム、日本精化社製)などがリボソーム膜形成脂質として特に好適に使用される。

リボソーム膜形成脂質の水溶液への懸濁は攪拌

型細胞破砕機を用いて懸濁粒子の外径が180~300nmになるまで攪拌することによって実施される。攪拌型細胞破砕機は攪拌羽根がカッターになっており、該カッターが10000rpm以上の回転をすることによって細胞を破砕する機械であり、ワーリングブレンダーとして知られている。攪拌は通常、回転数10000~20000rpmで6~10分間行なわれる。本発明の製法においては、懸濁粒子の外径を180~300nmになるまで懸濁を十分に行うことが重要である。

懸濁液を高圧吐出処理する工程は、高圧吐出型乳化機、好ましくはフレンチプレスを用いて懸濁液を100~2000、好ましくは500~1700kg/cm²の圧力で細隙から1~数回吐出させることによって実施される。その際懸濁液中の粒子が機器壁に高エネルギーで衝突し、この衝突によりリボソームが形成されると考えられ、高圧で吐出されるほどリボソームの粒径は小さくなる。かくして得られるリボソーム液は常法に従って洗浄され、超遠心処理等によって採取される。

[実施例]

以下に実施例を示して本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1.

1) 懸濁液の製造

水添添加率90%の精製ホスファチジルコリン(EPC)、コレステロール(chol)、ミリスチン酸(MA)の均一混合粉末(プレソーム、日本精化製、EPC/chol/MA=7:10:2.4(モル比))からなるリボソーム形成脂質36gをヘモグロビン濃度50%(v/v)の赤血球膜除去ヘモグロビン(スチローマフリーヘモグロビン、SFH)水溶液200mlに加え、4℃に冷却し、ワーリングブレンダーを用いて7分間攪拌した。光散乱法粒子径測定装置(DLS-700、柳ユニオン技研製)で測定したところ、懸濁粒子径は250nmであった。攪拌時間と懸濁粒子の大きさの関係を図に示す。

2) リボソームの形成

上記1)で得られた懸濁液をパール細胞破砕機に

注入し、ヘリウムガスで100kg/cm²に加圧して30分間放置した後、圧力を100kg/cm²に維持しながら細隙から吐出させ、リボソームを形成させた。

3) リボソームの精製

上記2)で得られたリボソームの懸濁液を生理食塩水で10倍に希釈し、次いで1μ、0.8μフィルター(カートリッジフィルター、トーセル)に順次通して粗大粒子を取り除いた。

かくして得られた濾液を血漿分離器(平膜超ろ型、テルモ社製)で処理してリボソームに取り込まれなかったヘモグロビンおよび微小粒子を除去した。濾液にヘモグロビンが検出されなくなるまで生理食塩水を追加して段階洗浄を繰り返し、最終的にヘモグロビン濃度が5%となるまで濃縮したリボソーム懸濁液300mlを得た。かくして得られたリボソームの粒子径は220nmであった。懸濁液中のヘモグロビン濃度:H(mg/ml)とリボソーム膜形成脂質濃度:L(mg/ml)の比L/Hを算出するとこの値が小さい程、少ない脂質量で多くのヘモグロビンが効率よくカプセル化されて

いることを示す。上記実施例における L/H は0.95であった。

〔比較例〕

水素添加率90%の精製ホスファチジルコリン23.3g、コレステロール11.7gおよびミリスチン酸3.7gをジクロロメタン300mlに溶解し、ジクロロメタンを蒸発させて除去し、残留物にヘモグロビン濃度50%(v/v)の赤血球膜除去ヘモグロビン200mlを加え、振盪により懸濁液とする。このときの懸濁粒子の大きさは950nmであった。

かくして得られた懸濁液を上記実施例2)および3)と同様の手法で処理してリボソームを形成、精製し、最終的にヘモグロビン濃度が5%のリボソーム懸濁液230mlを得た。かくして得られたリボソームの粒子径は420nmであり、 L/H は2.18であった。

上記の結果から、実施例のリボソームは比較例のものにくらべて粒子外径が小さく、しかもヘモグロビンのカプセル化効率が高いことが明らかである。

〔発明の効果〕

本発明は、内部に溶液を取り込んでなるリボソームであってリボソームの平均粒子外径が180~800nmであり、リボソーム膜形成脂質の重量を内部溶液の溶質重量で除した値が0.40~1.87であるリボソームからなり、リボソーム1個当たり少ない脂質で多くの内容物を取り込むことができる。その結果、リボソームの懸濁濃度を下げることができるので粘度も低下し、血管中に投与した場合に精製器に負担をかけない。また投与される脂質の量が少なくて済むので安全性の面から好ましい。さらに、リボソームの粒子外径が小さいので血管をつまらせるおそれがない。

本発明のリボソームは内部に種々の生理活性物質や薬物の水溶液を取り込み、マイクロカプセル化しているのでドラッグデリバリーとして使用され、特にヘモグロビン水溶液を含んだ人工赤血球として好適である。

4. 図面の簡単な説明

図は実施例においてリボソーム膜形成脂質を水

溶液に加えて攪拌し、懸濁させた場合の攪拌時間と懸濁粒子径の関係を示すグラフである。

特許出願人 テルモ株式会社

代理人 弁理士 高木千恵
(外1名)

